

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Darija Đukić
7230/PT

OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNIH IZVORA

ZAVRŠNI RAD

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta: „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Mentor: doc. dr. sc. Tomislava Vukušić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procesno-prehrambeno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

**OPTIMIRANJE PROCESA EKSTRAKCIJE BIOAKTIVNIH KOMPONENTI IZ BILJNIH
IZVORA**

Darija Đukić, 7230/PT

Sažetak: Svrha ovog rada je utvrditi utjecaj ne-toplinske metode ekstrakcije primjenom visokonaponskog pražnjenja na povećanje prinosa fenolnih spojeva iz biljnih materijala. Korištena su zelena otapala koja su ekološki prihvatljivija, netoksična i nezapaljiva. Tijekom istraživanja uzorci su tretirani pri različitim frekvencijama (0, 50, 100 i 150 Hz) i naponima (5, 15, 25 kV). Ekstrakcija se provodila 3, 6 i 9 minuta s 0, 25 i 50 % vodenom otopinom etanola. Rezultati su analizirani koristeći program STATGRAPHICS Centurion. Istraživanje je pokazalo da ovakva ekstrakcija ima veći prinos fenola od klasične ekstrakcije. Najveći prinos fenolnih spojeva utvrđen je pri naponu 25 kV i frekvenciji 150 Hz uz upotrebu 50 % vodene otopine etanola.

Ključne riječi: ekstrakcija, fenolni spojevi, optimiranje, visokonaponsko pražnjenje,

Rad sadrži: 27 stranica, 8 slika, 9 tablica, 30 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Tomislava Vukušić

Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak

Datum obrane: srpanj, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology
Department of Food Engineering
Laboratory for Food Processes Engineering
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF EXTRACTIONS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANT MATERIALS

Darija Đukić, 7230/PT

Abstract: The aim of this final work is to determine the influence of non-thermal treatment high voltage discharge to increase the yield of phenolic compounds from plant material. Green solvents were used in this study because they are environmentally acceptable, non-toxic or non-flammable. During the study the samples were treated with different frequencies (0, 50, 100 and 150 Hz) and voltages (5, 15, 25 kV). The extraction was performed for 3, 6 and 9 minutes with 0, 25 and 50 % of aqueous ethanol solution. The results were analyzed by using the STATGRAPHICS Centurion program. The study has shown that such extraction is higher phenol yield than classical extraction. The biggest yield is accomplished with voltage of 25 kV, frequency of 150 Hz and with 50% aqueous ethanol solution.

Keywords: extraction, high-voltage discharge, optimization, phenolic compounds,

Thesis contains: 27 pages, 8 figures, 9 tables, 30 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: *doc. dr. sc. Tomislava Vukušić*

Technical support and assistance: *Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*

Defence date: July, 2018.

Ovaj rad izrađen je u okviru projekta „Ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz mediteranskog bilja sa “zelenim otapalima” primjenom visokonaponskog pražnjenja” (IP-2016-06-1913) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ekstrakcija	2
2.1.1. Podjela ekstrakcije	2
2.1.2. Zelena ekstrakcija.....	3
2.1.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti.....	3
2.1.4. Polifenoli	4
2.2. Visokonaponsko električno pražnjenje	5
2.2.1. Plazma	6
2.2.2. Mehanizam djelovanja	6
2.2.3. Primjena plazme	7
2.3. Majčina dušica	7
2.3.1. Kemijski sastav	8
2.3.2. Primjena	8
2.4. Optimizacija	9
2.4.1. COSMO-RS	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Materijali.....	11
3.1.1. Uzorci	11
3.1.2. Reagensi.....	11
3.1.3. Aparatura i pribor	11
3.2. Metode rada.....	12
3.2.1. Ekstrakcija	12
3.2.2. Određivanje pH vrijednosti.....	14
3.2.3. Određivanje elektroprovodljivosti.....	14
3.2.4. Određivanje temperature	14
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola.....	14
3.2.6. Planiranje i optimiranje eksperimenta tretiranja	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. Utjecaj visokonaponskog pražnjenja	18
4.2. Statistička obrada podataka.....	19
5. ZAKLJUČAK	24
6. LITERATURA	25

1. UVOD

Razvojem tehnologije u prehrambenoj industriji javljaju se nove tehnike procesiranja koje usavršavaju postojeće postupke i metode, ali i pružaju mogućnost razvitka novih učinkovitih, ekonomičnijih i ekološki prihvatljivijih postupka. Mijenja se i svijest potrošača koji teže minimalno procesiranoj i nutritivno obogaćenoj hrani. Nove ne-toplinske metode ekstrakcije razvili su se kako bi se uklonio negativni utjecaj temperature na degradaciju bioaktivnih spojeva tijekom klasičnih ekstrakcija. Osim toga nastoji se smanjiti vrijeme ekstrakcije, upotreba otapala, nastanka velike količine otpadnih materijala uz poboljšanje energetske efikasnosti. Istraživanja su pokazala da nove inovativne metode poput ultrazvuka, visokog hidrostatskog tlaka i primjena plazme mogu u potpunosti zamijeniti pojedine klasične metode uz dobivanje proizvoda visoke kvalitete. Visokonaponsko pražnjenje je najčešći postupak dobivanja laboratorijske hladne plazme. Tijekom tretmana javljaju se brojni fenomeni koji uzrokuju oštećenje stanične strukture i olakšavaju ekstrakciju uz neznatno povišenje temperature.

Cilj ovog rada je prikazati teorijske osnove visokonaponskog pražnjenja u ekstrakciji bioaktivnih spojeva, usporediti učinak klasične ekstrakcije i ekstrakcije visokonaponskim pražnjenjem te odrediti optimalne parametre ekstrakcije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz čvrste (krute) tvari ili tekuće smjese odgovarajućim otapalom u kojem je tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka u smjesi. Princip ekstrakcije je molekularna difuzija u kojoj dolazi do izjednačavanja koncentracija otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni kontakt. Molekularna difuzija matematički se opisuje prvim Fickovim zakonom (Lovrić, 2003). Tvar dobivena ekstrakcijom izdvaja se u čistom obliku iz dobivene otopine kristalizacijom ili otparivanjem otapala (Lianfu i Zelong, 2008).

Za optimalnu ekstrakciju potrebno je osigurati dobro miješanje otapala i materijala koji se ekstrahira. Tijekom kontakta dviju faza omogućen je prijenos mase. Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, viskoznosti i volumnom protoku otapala te površini namirnice izložene otapalu (Herceg, 2011).

Procesa ekstrakcije se može ubrzati povišenjem temperature pri kojoj se provodi ekstrakcija i povećanjem dodirne površine između materijala i otapala. Povišenjem temperature povećava se brzina otapanja komponenti i brzina difuzije komponenti u otapalu (Ruso i sur., 1995). Nedostatak upotrebe povišene temperature je u mogućoj degradaciji i razgradnji poželjne bioaktivne komponente te može doći do ekstrakcije nepoželjnih komponenti. Prije ekstrakcije biljni materijal se usitnjava do određenog stupnja i homogenizira. Smanjenjem veličine čestice olakšava se prodor otapala kroz materijal i povećava se učinkovitost otapala. Ako se materijal previše usitni može doći do suprotnog efekta. Preusitnjeni materijal usporiti će kretanje otapala i ometati otapanje željenih komponenti u otapalu (Herceg, 2011).

2.1.1. Podjela ekstrakcije

Metode ekstrakcije mogu se podijeliti na konvencionalne i ne-konvencionalne. U konvencionalne metode ubrajaju se destilacija (direktna destilacija, destilacija vodenom parom i destilacija vodom i parom), ekstrakcija otapalima i hladno prešanje. Takve metode imaju niski prinos bioaktivnih komponenti, dugo vrijeme ekstrakcije te upotreba velikih količina materijala i otapala (Wang i Weller, 2006).

Razvojem tehnologije razvijaju se nove tehnike ekstrakcije koje omogućavaju smanjenje ili potpuno uklanjanje upotrebe otapala, poboljšanje energetske efikasnosti, prinosa i vremena

ekstrakcije te očuvanje bioaktivnih komponenti. Ne-konvencionalnim tehnikama smatraju se ekstrakcije superkritičnim fluidom, turbo ekstrakcija, ekstrakcija s električnom energijom, upotrebom hladne plazme, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ekstrakcija mikrovalovima.

2.1.2. Zelena ekstrakcija

Zelena ekstrakcija je ekstrakcija sa smanjenom potrošnjom energije te upotrebom alternativnih otapala i obnovljivih prirodnih resursa uz dobivanje stabilnog i kvalitetnog ekstrakta. Za provedbu zelene ekstrakcije na laboratorijskoj i industrijskoj razini mora se zadovoljiti tri uvjeta:

1. Poboljšanje i optimiziranje postojećih procesa
2. Upotreba novih uređaja
3. Inovacija u procesima i postupcima

Većina organskih otapala su zapaljivi, hlapljiv, toksični i predstavljaju veliki problem u onečišćivanju okoliša i efektu staklenika. Takva otapala u zelenoj ekstrakciji zamjenjuju se ekološki prihvatljivim zelenim otapalima. Zelena otapala su biorazgradiva, netoksična i nezapaljiva. Njihov nedostatak je visoka cijena, velika viskoznost i mogu stvarati neugodan miris (Chemat i sur., 2012).

2.1.3. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti

Bioaktivni spojevi su sastojci hrane koji utječu na fiziološke ili stanične aktivnosti ljudi ili životinja koji ih konzumiraju. U skupinu bioaktivnih spojeva spadaju brojni spojevi (alkaloidi, fenolni spojevi, karotenoidi, terpeni, terpenoidi...) s različitim strukturama, hidrofilnim ili lipofilnim svojstvima, različitom rasprostranjenosti u prirodi, rasponom koncentracija u biljnim materijalima i različitim djelovanjem u organizmu (Porrini i Riso, 2008). Pozitivna svojstva bioaktivnih spojeva su antioksidacijsko i biološko djelovanje, inhibicija ili indukcija pojedinih enzima, inhibicija aktivnosti receptora te inhibicija ili indukcija ekspresije gena (Mahfoudhi i sur., 2016).

Zbog nestabilnosti u prehrambenim proizvodima tijekom prerade i pripreme te njihove male biodostupnosti upotreba aktivnih spojeva je ograničena (Mahfoudhi i sur., 2016). Svaka biljka ima specifičan kemijski sastav i potrebni su različiti uvjeti ekstrakcije kako bi se osigurao

maksimalni prinos bioaktivnih spojeva (Chirinos i sur., 2007). Najvažniji parametri ekstrakcije bioaktivnih spojeva je vrsta ekstrakcije, koncentracija i vrsta otapala, veličina čestica i sastav materijala, temperatura, pH i vrijeme ekstrakcije (Liyana-Patthirana i Shahidi, 2005). Za odabir vrste ekstrakcije važno je poznavati veličinu, naboj, polarnost i stabilnost molekule koja se izolira iz tekuće smjese ili čvrste tvari (Uzelac-Dragović, 2017). Ekstrakcija bioaktivnih komponenti iz biljnih vrsta najčešće se provodi polarnim otapalima, a najprikladnija otapala su mješavina vodenih otopina etanola, metanola, acetona i etil acetata (Peschel i sur., 2006).

Primjenom toplinske ekstrakcije bioaktivnih spojeva može doći do gubitaka zbog njihove nestabilnosti pri povišenim temperaturama te sklonosti oksidaciji i hidrolizi. Stoga glavni problem toplinskih ekstrakcija je ograničenost izolacije termolabilnih spojeva (Luque de Castro i Garcia-Ayuso, 1998). Ograničenje se može izbjeći provođenjem ekstrakcije pomoću modernih ne toplinskih tehnika.

2.1.4. Polifenoli

Polifenolni spojevi su skupina sekundarnih biljnih metabolita koji imaju važnu ulogu u rastu, reprodukciji i zaštiti biljke od patogena. Osnovna struktura polifenola je aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina sa širokim rasponom polimerizacije (Bravo, 1998). Polifenolni spojevi mogu biti jednostavni spojevi poput fenolnih kiselina, ali i visokopolimerizirane molekule poput lignina i tanina (Balasundram i sur., 2006). Osnovna podjela polifenola je na fenolne kiseline, flavonoide, tanine i ostale polifenole. Široko su rasprostranjeni u biljnim vrstama i nalaze se u sjemenkama, pokožici, mezokarpu voća i povrća, kori drveća, lišću i cvijeću (Naczki i Shahidi, 2006).

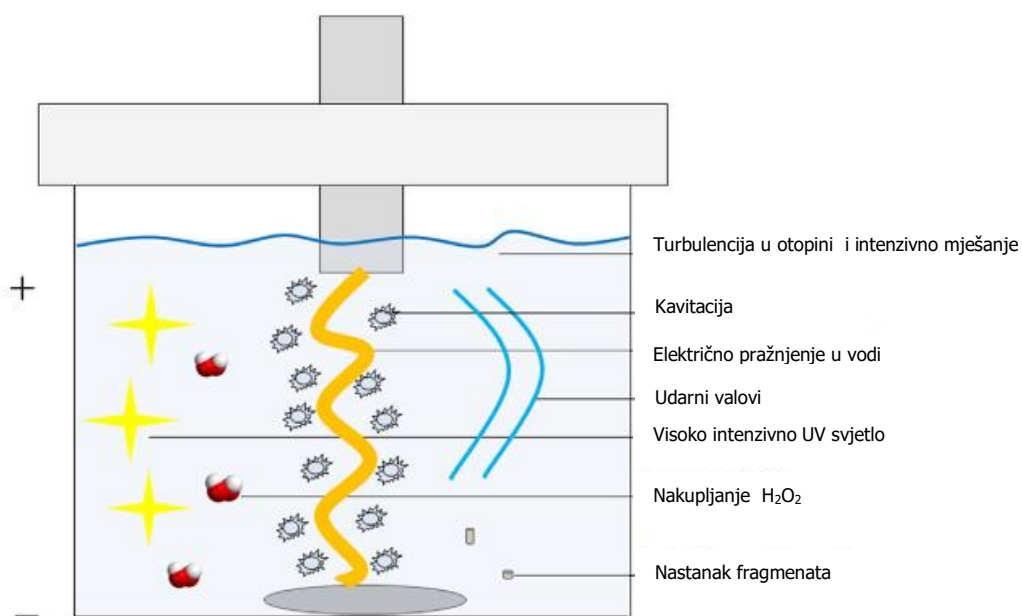
Njihova uloga u biljkama je zaštita biljke od UV zračenja, ekstremnih temperatura, zagađenja zraka, infekcija i grabežljivaca te utječu na senzorske karakteristike, pigmentaciju i oksidacijsku stabilnost biljnih vrsti. Visok udjel polifenola mogu uzrokovati gorčinu i trpkost proizvoda (Naczki i Shahidi, 2004). Sastav i koncentracija polifenola varira ovisno o vrsti biljke, ali i tehnikama uzgoja, procesu zrenja, vremenu berbe te uvjetima obrade i skladištenja (Naczki i Shahidi, 2006).

Polifenolni spojevi zbog svoje strukture djeluju kao antioksidansi. Hidroksilna skupina u molekuli polifenola dobar je proton donor i ima sposobnost sparivanja elektrona slobodnog radikala i tako zaustavlja lančanu reakciju slobodnih radikala. Također polifenoli imaju

sposobnost vezanja prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

2.2. Visokonaponsko električno pražnjenje

Visokonaponsko električno pražnjenje je ne toplinska metoda čija se primjena u prehrambenoj industriji temelji na fenomenu električnog sloma u otopini (Gros i sur., 2003). Može se primijeniti u ekstrakciji bioaktivnih komponenti jer tijekom električnog pražnjenja dolazi do električnog sloma i razbijanja stanične strukture biljnog materijala (Boussetta i Vorobiev, 2014). Struktura stanice oštećuje se zbog sekundarnih fenomena koji se javljaju tijekom HVED tretmana i olakšavaju ekstrakciju bioaktivnih molekula iz stanice. Ti sekundarni fenomeni su tekuća turbulencija, kavitacija, mjehurići te visoki amplitudni tlak (Liu i sur., 2011).



Slika 1. Prikaz mehanizma visokonaponskog pražnjenja u otopini (Rajha i sur., 2015)

Tijekom tretmana između dvije elektrode u ionskim otopinama dolazi do električnog pražnjenja i stvaranja plazme. Pomoću električne energije povećava se kretanje čestica i učestalost njihovih sudara. U ne elastičnim sudarima dolazi do prijenosa energije s elektrona na neutralnu molekulu te pobuđivanja i ionizacija neutralnih molekula. Elektroni se koriste za prijenos energije zbog male mase i velike pokretljivosti. Ako elektron u sudaru ima dovoljno energije uzrokovat će izboj elektrona i pozitivno nabijenih čestica iz neutralne molekule ili atoma. Povećanjem energije sudara proporcionalno se i povećava vjerojatnost pobude atoma ili

molekule u više energetska stanja, njihova disocijacija ili ionizacija atoma (Milošević, 2008). Stvorenu plazmu čine visoko energetski elektroni, ioni i radikali (Kozakova, 2011).

2.2.1. Plazma

Plazma je ionizirani plin koji se sastoji od elektrona, iona i neutralnih čestica koje mogu biti u osnovnom ili pobuđenom stanju (Milošević, 2008). Plazma je četvrto osnovno stanje materije i kvazineutralan plin jer makroskopski gledano plazma ne posjeduje električni naboj. Električki je neutralna jer sadrži jednak broj pozitivno i negativno nabijenih čestica. Ostala svojstva plazme su dobra provodljivost električne energije, sadrži nosače naboja te reagira na elektromagnetska polja (Tendero i sur., 2006).

Plazma se prema temperaturi pri kojoj se primjenjuje dijeli na hladnu plazmu i vruću plazmu. Vruću plazmu karakterizira stanje termičke ravnoteže jer je temperatura svih čestica u plazmi jednaka. Temperatura je iznad 6000 K (Schlüter i sur., 2013). Hladna plazma ima nejednaku temperaturu čestica, a najvišu temperaturu imaju elektroni. Ukupna temperatura hladne plazme je niska i obično je to vrijednost sobne temperature što omogućava visoku primjenu u prehrambenoj industriji bez opasnosti od degradacije poželjnih spojeva (Pankaj i Keener, 2017).

2.2.2. Mehanizam djelovanja

Tijekom električnog pražnjenja dolazi do niza fizikalnih i kemijskih promjena u otopini. U fizikalne promjene ubrajaju se UV radijacija, stvaranje udarnih valova, snažno električno polje, kavitacija te ostali fenomeni.

Osim toga, u otopini brojnim kemijskim reakcijama nastaju reaktivne tvari. U vodenim otopinama ekscitacijom i ionizacijom nastaje vodikov peroksid, ozon te hidroksilni, vodikovi i kisikovi radikali. Nastale čestice mogu biti kratko živuće poput radikala i dugo živuće u koje se ubrajaju ioni i neutralne molekule s visokim oksidacijskim potencijalom (Kozakova, 2011).

Reakcije inicijacije u vodi započinje disocijacijom i ionizacijom molekula vode zbog njihovih sudara s visokoenergetskim elektronima.





Nastali radikali mogu međusobno reagirati uz nastanak stabilnih molekula poput H_2 , H_2O_2 i H_2O ili reagirati s drugim molekulama vode u otopini.



2.2.3. Primjena plazme

Plazma se zbog svojih svojstva ekološke prihvatljivosti i fleksibilnosti primjenjuje u raznim područjima poput elektronike, tekstilne industrije, aeronautike, biomedicinskom području te prehrambenoj industriji (Misra i sur., 2011). Najraširenija primjena plazme u prehrambenoj industriji je dezinfekcija vode plazmom i ozonom. Koristi se za inaktivaciju mikroorganizama s površine voća i povrća, a pogotovo je pogodna za neprocesirane ili minimalno procesirane proizvode. Plazma se može koristiti za inaktivaciju i smanjenje broja mikroorganizama na suhim začинима koji se dodaju u hranu, a kasnije se ne obrađuju termički (Kozakova, 2011). Primjenjuje se kao alat za čišćenje površina ili ambalažnog materijala. Zbog niske temperature pri tretmanu pogodna je za ekstrakciju bioaktivnih spojeva (Misra i sur., 2011).

2.3. Majčina dušica

Majčina dušica (*Thymus serpyllum*) je ljekovita aromatska biljka iz porodice *Lamiaceae*. Rasprostranjena je na umjerenom prostoru euroazijskog kopna, sjeverne Afrike i Sjeverne Amerike. Raste na suhom i sunčanom tlu, travnjaku, pašnjaku te obroncima degradiranih šuma. Ne raste na sjenovitom i vlažnom tlu, a zbog dubokog korijena i kožnatih listova dobro podnosi sušu (Dragović-Uzelac, 2017).

Majčina dušica raste u obliku grma, visine do 30 centimetara. Stabiljka može biti polegnuta ili uzdignuta, a pri dnu je najčešće odrvenjela ljubičastocrvene boje. Cvjetovi su svijetloružičaste do purpurne boje. Listovi su okruglasto jajolikog oblika dužine od 0,5 do 1,5 centimetara. Na

listovima se nalaze žlijezde odgovorne za proizvodnju eteričnog ulja u obliku smeđih točkica (Toplak-Galle, 2001).

2.3.1. Kemijski sastav

Majčina dušica sadrži 0,1 - 0,6 % eteričnog ulja. Najznačajniji spojevi su fenolski monoterpeni karvakrol i timol. Sadrži još linalol, citral, 1,8-cineol, linalilacetat, borneol, geraniol, flavonoide i triterpenske kiseline. Od flavonoida u eteričnom ulju majčine dušice pronađeni su kvercetin, eriocitrin te glikozidi apigenina i luteolina. Također sadrži timokinon, tanine te značajne fenolne kiseline (ružmarinsku, klorogensku i kafeinsku kiselinu) (Toplak-Galle, 2005). Od ukupnih fenola 70 % čine flavonoidi.



Slika 2. Majčina dušica (Dragović-Uzelac, 2017)

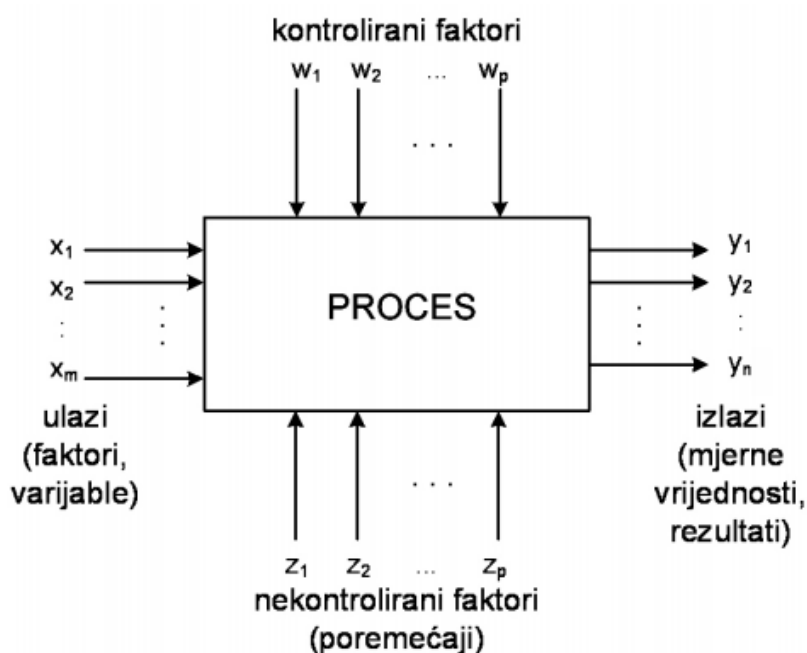
2.3.2. Primjena

Upotrebljava se u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Često se koristi u narodnoj medicini zbog svojeg spazmolitičkog i antiseptičkog djelovanja čime ublažava kašljaj te djeluje protiv prehlade. Pomaže kod gastroenteroloških poremećaja, grčeva u trbuhu i poboljšava funkciju crijeva i želuca (Dragović-Uzelac, 2017). Eterično ulje ublažava reumatizam te se koristi pri liječenju protiv gubitka kose (Nikolić i sur., 2013).

Miris eteričnog ulja djeluje umirujuće na vegetativni živčani sustav, stoga se često koristi kao psihoterapeutik u aromaterapiji odraslih osoba i djece (Toplak-Galle, 2005). Prisustvo gorkih tvari i poželjnog okusa potiče apetit te se majčina dušica koristi za korekciju okusa i mirisa (Dragović-Uzelac, 2017).

2.4. Optimizacija

Optimiranje i koncept planiranja pokusa zasniva se na mogućnosti kontrole pojedinih faktora koji utječu na istraživani proces, oblikovanje modela po stohastičnom načelu i eliminaciju utjecaja nekontroliranih faktora u procesu. Planiranje pokusa obuhvaća odabir adekvatnog modela pokusa iz već postojećeg kataloga pokusa ili oblikovanjem. Važno je u obzir uzeti ograničavajuće faktore i kriterije optimalnosti (Cajner, 2011).



Slika 3 . Opći model pokusa (Cajner, 2011)

Za utvrđivanje optimalnih uvjeta određenog procesa nije dovoljno optimirati samo jedan faktor nego uzeti u obzir interakciju između faktora. Faktorski dizajn (središnji kompozitni dizajn-CCD) koristi se za određivanje učinka svakog faktora, ali i njihove interakcije. Ulazna varijabla mogu biti brojni parametri i svi se moraju istodobno mijenjati. Za dodatno poboljšanje optimizacije procesa koristi se metoda odzivne površine (RSM) (Režek-Jambrak, 2011).

Metoda odzivne površine obuhvaća skup statističkih i matematičkih modela koji se primjenjuju za razvoj, poboljšanje i optimiranje procesa. Osnovni zadatak metode je dobiti odnos utjecajnih nezavisnih faktora na zavisnu varijablu (Cajner, 2011).

2.4.1. COSMO-RS

COSMO-RS (The Conductor-like Screening Model for Real Solvents) je metoda predviđanja termodinamičkih svojstava čistih tekućina i mješavina tekućina na temelju kombinacija kvantnih kemijskih izračuna i statističkih podataka termodinamike (Pozarska i sur., 2013). Određuje se površinska gustoća naboja molekule i koristi se za izračunavanje kemijskog potencijala svake vrste u otopini. Dobiveni kemijski potencijali temelj su za druge termodinamičke karakteristike poput koeficijenta aktivnosti, topljivosti, tlaka pare i slobodne energije otapanja (Klamt, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

- Osušeni i usitnjeni listovi majčine dušice (Franck, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Reagensi

- otapalo: destilirana voda i etanol:voda
- 30%-tna vodena otopina etanola
- Folin-Ciocalteu reagens
- standardna otopina ružmarinske kiseline
 - Priprema: U odmjernu tikvicu volumena 100 mL otopi se 50 mg ružmarinske kiseline u 30%-tnoj vodenoj otopini etanola te se istom otopinom nadopuni do oznake.
- zasićena otopina natrijeva karbonata, Na_2CO_3
 - Priprema: U odmjernu tikvicu volumena 1000 mL otopi se 200 g anhidrida natrijeva karbonata u 800 mL vruće destilirane vode te ohladi na sobnu temperaturu. Zatim se doda nekoliko kristalića natrijeva karbonata te se do oznake napuni destiliranom vodom. Pripremljena otopina treba odstajati 24 sata te se nakon toga profiltrira.

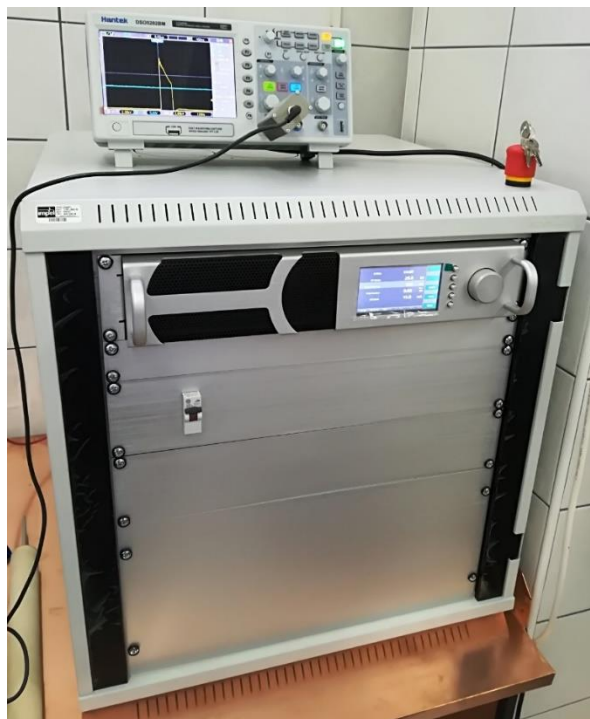
3.1.3. Aparatura i pribor

- generator (IMP-SSPG-1200)
- Büchnerov lijevak
- odmjerne tikvice volumena 10 ml, 25 ml i 100 ml
- mikropipeta i pipete volumena 2 ml, 5 ml, 20 ml i 25 ml
- vodena kupelj
- spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
- kivete
- digitalni pH metar (pH 340i/ SET, WTW)
- digitalni konduktometar (λ 340i/ SET, WTW)
- infracrveni termometar (PCE-777, PCE Instruments)

3.2. Metode rada

3.2.1. Ekstrakcija

U ovom istraživanju ekstrakcija se provodi u generator IMP-SSPG-1200 koji generira hladnu atmosfersku plazmu u uzorku.

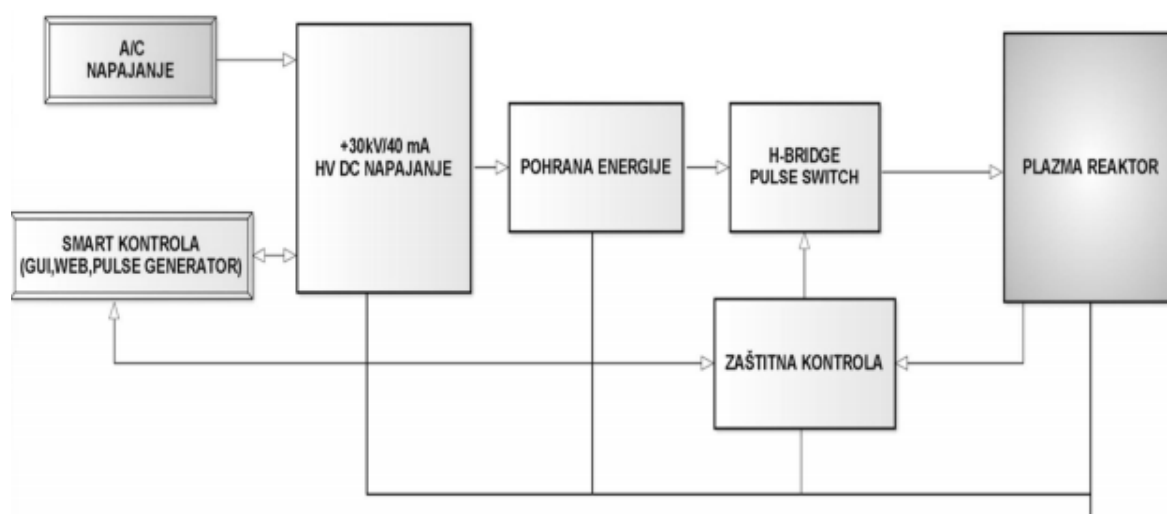


Slika 4. Plazma generator (Anonymous, 2017)

Tehnički parametri plazma generatora IMP-SSPG-1200:

- podesivost DC napon u području 1kV do 30kV
- podesivost maksimalne DC struja 40 mA@30kV
- solid state generiranje pravokutnih impulsa iz HV DC napona (max. 100 kHz)
- industrijski komunikacijski standardi RS485 MODBUS za proširivost prema vanjskim uređajima (analogni i digitalni I/O modul, senzori, pretvarači....)
- TCP/IP s web serverom za daljinsko upravljanje i parametriziranje
- napajanje 230 VAC jedna faza, 50Hz
- ambijentalna temperatura 5° C do 40° C , ambijentalna vlažnost 10% do 90%,
- forsirano zračno hlađenje

Princip rada generatora je generiranje visokog DC napona pomoću moderne solid state tehnologije. Jedan valni oblik napona (izmjenični napon AC) prevodi se u drugi (istosmjerni napon DC te visoko frekventni napon HF).



Slika 5. Blok dijagram plazma generatora (Anonymous, 2017)

Prije ekstrakcije izvaže se određena masa osušenog materijala te se pomiješa s 50 mL odgovarajućeg otapala. Dobivena smjesa ekstrahira se u reaktoru u struji argona određeno vrijeme pri odgovarajućim uvjetima napona i frekvencije. Dobiveni ekstrakt filtrira se pomoću Büchnerovog lijevka.

Tablica 1. Prikaz parametra tretiranja uzoraka majčine dušice

Uzorak	Masa uzorka (g)	Frekvencija (Hz)	Vrijeme (min)	Udio etanola (%)	Napon (kV)
MA2	5	150	9	50	5
MA5	5	50	3	0	25
MA7	5	100	6	25	15
MA10	3	100	6	25	15
MA14	5	150	3	50	25
MA16	1	100	6	25	15
MA18	1	100	9	75	15

MA21	1	0	6	25	15
MA24	1	100	6	25	15
MA32	3	150	9	50	25

Oznaka MA označava da se uzorak majčine dušice tretirao u generatoru u struji argona.

3.2.2. Određivanje pH vrijednosti

Mjerenje pH vrijednosti nakon tretmana vrši se očitavanjem vrijednosti na pH-metru (pH 340i/SET, WTW, elektroda HI11310). Kalomel elektroda mora biti uronjena u uzorak 5 minuta nakon čega se očitava pH-vrijednost.

3.2.3. Određivanje elektroprovodljivosti

Određivanje elektroprovodljivosti uzorka nakon tretmana vrši se pomoću konduktometra (λ 340i/ SET, WTW, elektroda HI763100). Elektroda se uroni u uzorak i drži do stabilizacije vrijednosti na konduktometru.

3.2.4. Određivanje temperature

Temperatura uzorka nakon tretmana se mjeri digitalnim infracrvenim termometrom (Infrared Tehrmometer,PCE-777, PCE Instruments).

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja ukupnih fenola u dobivenim ekstraktima temelji se na kolornoj reakciji koja je posljedica reakcije fenolnih spjeva s Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (FC reagens). Intenzitet nastalog obojenja mjeri se primjenom spektrofotometrijske metode pri 760 nm (Ough i Amerine, 1998). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline se reduciraju u volframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni.

Postupak određivanja

U odmjernu tikvicu volumena 25 mL otpipetira se redom: 250 μ L uzorka (prethodno razrijeđenog otapalom u omjeru 1:9), 15 mL destilirane vode, 1,25 mL FC reagensa (FC reagens miješa se s destiliranom vodom u omjeru 1:2 neposredno prije mjerenja) te nakon 3 minute 3,75 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Uzorci se nadopune odgovarajućim otapalom do oznake i stavljaju u vodenu kupelj na termostatiranje pri 50°C 30 minuta. Na isti način se pripremi slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta stavi 250 μ L otapala. Nakon termostatiranja uzorci se ohlade pod vodom, te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 760 nm.

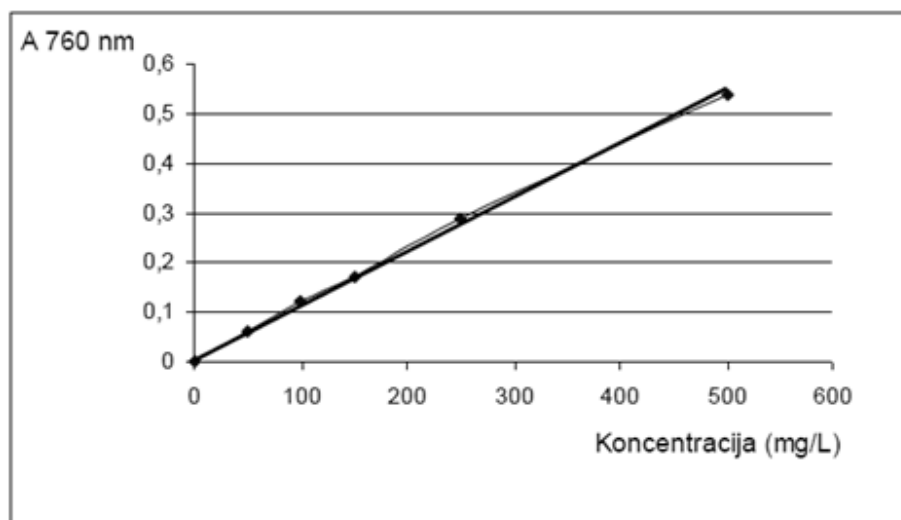
Izrada baždarnog dijagrama

Za određivanje vrijednosti ukupnih fenola potrebno je izraditi baždarni dijagram kako bi se eliminirao utjecaj ostalih komponenti u smjesi. U odmjernim tikvicima volumena 10 mL razrjeđuju se pripremljene otopine ružmarinske kiseline koncentracije 500 mg/L. Razrjeđenja se pripreme tako da se u odmjernu tikvicu doda 0,1, 2, 3, 5 i 10 mL ružmarinske kiseline i nadopuni 30%-tnom vodenom otopinom etanola do oznake. Napravljena razrjeđenja imaju koncentraciju ružmarinske kiseline: 0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L.

U odmjernu tikvicu volumena 25 mL iz svake tikvice otpipetira se 250 μ L uzorka i postupa se po propisu za određivanja ukupnih fenola. Baždarni pravac nacrtava se pomoću računala tako da se na apscisu nanese koncentracije ružmarinske kiseline (mg/L), a na ordinati vrijednosti apsorbancije mjerene pri 760 nm.

Račun

Koncentracija ukupnih fenola u uzorku izračunava se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Excel.



Slika 6. Baždarni dijagram

$$y=0,0011x \quad R^2=0,991$$

y- apsorbancija na 760 nm

x- koncentracija ružmarinske kiseline (mg/L)

R²- koeficijent determinacije

3.2.6. Planiranje i optimiranje eksperimenta tretiranja

Eksperiment je dizajniran u STATGRAPHICS Centurion (StatPoint technologies, Inc., VA 20186, USA) softveru u cilju utvrđivanja statičkog utjecaja svakog faktora. Nezavisne varijable su masa uzorka, frekvencija, vrijeme, udio etanola i napon. Eksperiment je organiziran u faktorijalnom dizajnu (uključivši faktorijalne točke, aksijalne točke i centralne točke), a ostatak uključujući replikaciju centralne točke kako bi se dobila dobra procjena eksperimentalnih grešaka. Izlazne vrijednosti su provodnost, pH vrijednost, temperatura i ukupni fenoli.

S faktorijalnim planom pokusa nastoji se odrediti uzročno- posljedične veze zavisnih i nezavisnih varijabli. U faktorijalnom eksperimentu, osim utjecaja pojedinih nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu, može se utvrditi da li postoji interakcijski efekt. Planiranje faktorijalnog eksperimenta usko je povezano s planiranjem statističke analize rezultata u zavisnoj varijabli.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog eksperimenta je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije biljnog materijala pomoću visokonaponskog pražnjenja. Optimalni uvjeti ekstrakcije omogućit će veliki prinos fenola uz sprječavanje njihove degradacije. Fenolni spojevi su biološki važni spojevi s brojnim pozitivnim učincima i poželjni su u hrani.

U tablicama 2. i 3. prikazani su rezultati mjerenja provodnosti, pH vrijednosti, temperature i ukupnih fenola za netretirane i tretirane uzorke majčine dušice.

Kod netretiranih uzoraka prvi broj u oznaci uzorka označava vrijeme ekstrakcije (3, 6 i 9 minuta). Slovo "N" označava netretirani uzorak, a slovo "M" majčinu dušicu. Sljedeći broj prikazuje udio etanola u vodenoj otopini koja je korištena kao otapalo pri ekstrakciji. U ovom istraživanju koristila se vodena otopina s 0 %, 25 % i 50 % etanola. Zadnji broj označava masu uzorka u gramima.

Tablica 2. Rezultati ekstrakcije netretiranih uzoraka majčine dušice

Uzorak	Provodnost mS/ cm	pH vrijednost	Temperatura °C	Ukupni fenoli mg GAE/g uzorka
3NMO/1	0,62	5,91	20,60	6,87
6NMO/1	0,63	5,74	20,80	17,97
9NMO/1	0,56	5,77	20,60	23,07
3NMO/3	1,53	5,88	21,10	7,54
6NMO/3	1,56	5,74	20,00	5,99
9NMO/3	1,51	6,35	21,00	19,69
3NMO/5	2,50	5,94	21,10	12,59
6NMO/5	2,39	5,64	20,70	21,23
9NMO/5	2,35	5,80	20,20	21,32
3NM25/1	0,32	6,06	20,90	10,60
6NM25/1	0,36	6,21	22,40	7,32
9NM25/1	0,28	6,03	20,90	22,47
3NM25/3	0,40	6,02	20,50	11,24
6NM25/3	0,57	6,01	22,00	14,29
9NM25/3	0,59	6,08	20,20	43,94
3NM25/5	0,86	5,94	20,50	15,56
6NM25/5	0,81	6,06	20,50	18,62

9NM25/5	0,71	5,96	20,60	18,44
3NM50/1	0,13	6,28	20,20	1,47
6NM50/1	0,12	6,36	20,40	3,27
9NM50/1	0,12	6,28	20,40	11,07
3NM50/3	0,27	6,30	21,50	9,04
6NM50/3	0,34	6,23	20,60	17,84
9NM50/3	0,32	6,23	21,70	13,89
3NM50/5	0,42	6,08	20,30	11,75
6NM50/5	0,45	6,04	20,20	16,52
9NM50/5	0,44	6,09	20,60	17,93

Tablica 3. Rezultati tretiranih uzoraka majčine dušice

Uzorak	Provodnost mS/ cm	pH vrijednost	Temperatura °C	Ukupni fenoli mg GAE/g uzorka
MA2	0,54	6,17	22,50	27,47
MA5	2,42	5,84	21,30	28,58
MA7	1,09	5,98	22,30	23,96
MA10	0,71	6,11	22,50	15,74
MA14	0,49	6,14	24,30	26,73
MA16	0,29	6,23	22,80	12,87
MA18	0,04	6,70	23,10	17,37
MA21	0,27	6,15	23,30	18,72
MA24	0,28	6,09	23,40	26,82
MA32	0,35	6,28	27,70	32,04

4.1. Utjecaj visokonaponskog pražnjenja

Proučavanjem dobivenih rezultata može se odrediti kako pojedini faktori poput mase uzorka, vremena tretmana ili udjela etanola u otopini mogu utjecati na karakteristike dobivenog ekstrakta. Osim toga usporedbom rezultata netretiranih i tretiranih uzoraka može se odrediti uspješnost ekstrakcije potpomognute visokonaponskim pražnjenjem odnosno plazmom.

Povećanjem udjela etanola u vodenoj otopini smanjuje se provodnost uzoraka. U skladu s očekivanjem smanjenjem udjela vode koja je dobar vodič električne struje, a povećanjem udjela etanola koji nije dobar vodič vrijednost elektroprovodnosti se smanjuje. Povećanjem mase uzorka proporcionalno se povećava provodnosti uzorka, dok vrijeme tretmana nije značajno utjecalo na provodnost. Tretirani uzorci imaju manju provodnosti od tretiranih uzoraka.

Drugi promatrani faktor je promjena pH vrijednosti u uzorcima. Masa uzorka i vrijeme ekstrakcije nisu utjecali na pH vrijednost uzorka. Blago povećavanje pH vrijednosti vidljivo je kod uzoraka s većim udjelom etanola. Tretirani uzorci imaju višu pH vrijednost od netretiranih uzoraka. Povišenje pH vrijednosti je posljedica veće ekstrakcije fenolnih spojeva koji sadrže minimalno jednu hidroksilnu skupinu koja povećava pH (Bravo, 1998).

Tijekom tretmana dolazi do blagog povišenja temperature tretiranih uzoraka koji nije viši od 5 °C u odnosu na netretirane uzorke. Stoga se može utvrditi da je ovaj postupak ekstrakcije ne toplinski i da pri njemu neće doći do degradacije biološki aktivnih spojeva zbog povišenja temperature. Ostali parametri nisu utjecali na temperaturu uzorka.

Uzorci tretirani visokonaponskih pražnjenjem plazmom imaju veći udio fenolnih spojeva od netretiranih uzoraka u svim uvjetima ekstrakcije. U skladu s očekivanjem tijekom tretmana uzorka došlo je do razbijanja njegove stanične strukture i ostalih fenomena koji su olakšali difuziju otapala pa posljedično i ekstrakciju fenolnih spojeva (Liu i sur., 2011). Povećanjem mase uzorka i vremena ekstrakcije povećavala se koncentracija ekstrahiranih fenolnih spojeva.

4.2. Statistička obrada podataka

Pomoću software programa STATGRAPHICS te analizom varijanci obrađeni su eksperimentalni podaci i utvrđeni optimalni uvjeti ekstrakcije, utjecaj pojedinih parametara i njihova međusobna interakcija.

Analizom varijanci dobiveni su rezultati prikazani u tablici 4. Zavisna varijabla je frekvencija (Hz), a nezavisna masa uzorka (g).

Tablica 4. Statistička značajnost polinoma odnosa frekvencije i mase uzorka

		<i>Standard</i>		
<i>Parametri</i>	<i>Procjena</i>	<i>Greška</i>	<i>Statistika</i>	<i>P-vrijednost</i>
Konstanta	113,39	52,59	2,16	0,07
masa uzorka	-2,87	11,10	-0,26	0,80
masa uzorka ²	0,15	0,51	0,33	0,77

Odnos frekvencije i mase uzorka može se prikazati polinomom drugog reda:

$$\text{frekvencija} = 113,39 - 2,87 \cdot \text{masa uzorka} + 0,15 \cdot \text{masa uzorka}^2$$

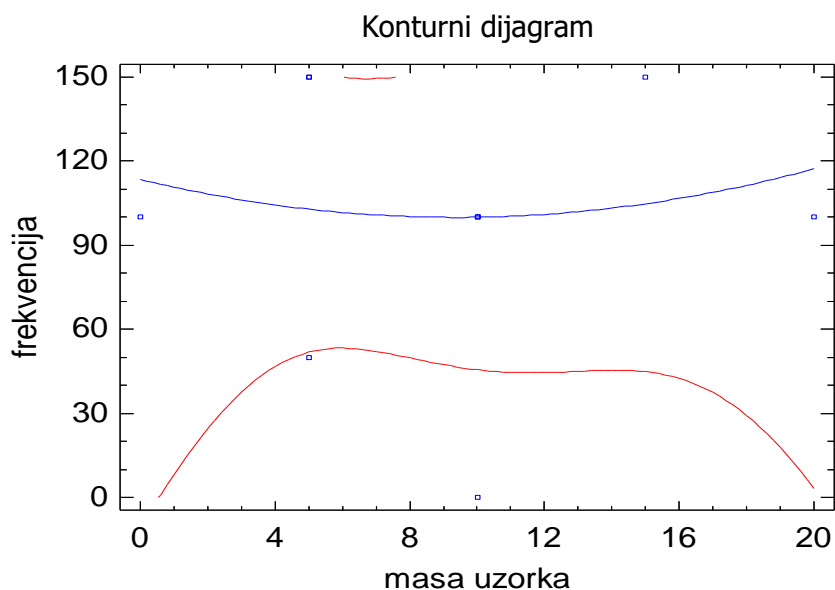
P-vrijednosti parametra polinoma veće su od 0,05, stoga polinom nije statistički značajan pri 95% ili višoj razini pouzdanosti.

Tablica 5. Statistička značajnost odnosa frekvencije i mase uzorka

<i>Izvor</i>	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost.</i>
Model	6897,37	2	3448,68	0,05	0,95
Ostatak	462914,00	7	66130,60		
Ukupno	469812,00	9			

$$R^2 = 1,47 \%, \quad R^2 (\text{ prilagođen za Df}) = 0,0\%$$

Pošto je dobivena p-vrijednost u ANOVI prikazana u tablici 5. veća od 0,05 ne postoji statistički značajan odnos između frekvencije i mase uzorka. Kvadratna R vrijednost pokazuje varijabilnost frekvencije od 1,47 %.



Slika 7. Konturni dijagram odnos frekvencije i mase uzorka

Analizom varijanci gdje je nezavisna varijabla frekvencija (Hz), a zavisna varijabla napon (kV) dobiveni su rezultati prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Statistička značajnost polinoma odnosa frekvencije i napona

		<i>Standard</i>		
<i>Parametari</i>	<i>Procjena</i>	<i>Greška</i>	<i>Statistika</i>	<i>P-vrijednost</i>
Konstanta	18,79	8,18	2,29	0,06
frekvencija	-0,03	0,19	-0,18	0,86
frekvencija ²	0,00	0,00	0,17	0,87

Odnos frekvencija i napona opisan je polinomom drugog reda:

$$\text{napon} = 18,80 - 0,03 \cdot \text{frekvencija} + 0,01 \cdot \text{frekvencija}^2$$

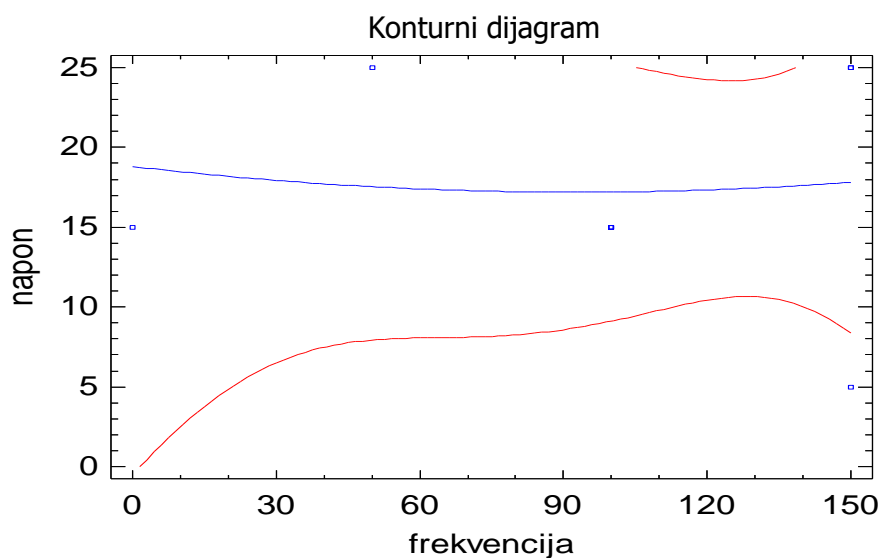
Pošto je p-vrijednost veća od 0,05 polinom nije statistički značajan u pouzdanosti od 95 % ili više.

Tablica 7. Statistička značajnost odnosa frekvencije i napona

Izvor	<i>Zbroj kvadrata</i>	<i>Df</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-omjer</i>	<i>P-vrijednost</i>
Model	45,75	2	22,87	0,02	0,98
Ostatak	9879,32	7	1411,33		
Ukupno	9925,07	9			

$$R^2 = 0,46 \%, \quad R^2 (\text{ prilagođen za Df}) = 0,0\%$$

Analizom varijanci dobivena je p-vrijednost viša od 0,05 pa ne postoji statistički značajan odnos napona i frekvencije pri 95% ili više pouzdanosti. Kvadratna R vrijednost pokazuje varijabilnost napona od 0,46 %.



Slika 8. Konturni dijagram odnosa napona i frekvencije

Određen je i utjecaj pojedinih faktora na koncentraciju ukupnih fenola u uzorku. Analizirane su sljedeće varijable: frekvencija (Hz), masa uzorka (g), napon (kV), udio etanola (%) i vrijeme (min).

Tablica 8. Prikaz statističkih parametra za pojedinu varijablu

	<i>Frekvencija</i>	<i>Masa uzorka</i>	<i>Napon</i>	<i>Udio etanola</i>	<i>Vrijeme</i>
Mjerenja	10	10	10	10	10
Srednja vrijednost	100,00	9,00	17,00	35,00	6,60
Standardna devijacija	47,14	5,68	6,32	21,08	2,76
Varijanca	47,14%	63,07%	37,20%	60,23%	41,77%
Minimum	0,00	0,00	5,00	0,00	3,00
Maksimum	150,00	20,00	25,00	75,00	12,00
Raspon	150,00	20,00	20,00	75,00	9,00
Standardna asimetrija	-1,28	0,62	-0,17	0,50	0,78
Standardna spljoštenosti	0,77	0,36	0,11	0,24	0,26

Vrijednosti standardne asimetrije i spljoštenosti izvan intervala od -2 do +2 ukazuju na značajna odstupanja od normalnosti. Niti jedna varijabla nije izvan tog intervala.

Tablica 9. Korelacija između varijabli

	Frekvencija	Masa uzorka	Napon	Udio etanola	Vrijeme
Frekvencija		-0,03	0,05	0,70	0,31
		(10)	(10)	(10)	(10)
		0,92	0,87	0,04	0,35
Masa uzorka	-0,03		0,03	0,10	0,35
	(10)		(10)	(10)	(10)
	0,92		0,93	0,76	0,29
Napon	0,05	0,03		-0,09	-0,49
	(10)	(10)		(10)	(10)
	0,87	0,93		0,77	0,14
Udio etanola	0,70	0,10	-0,09		0,24
	(10)	(10)	(10)		(10)
	0,04	0,76	0,77		0,47
Vrijeme	0,31	0,35	-0,49	0,24	
	(10)	(10)	(10)	(10)	
	0,35	0,29	0,14	0,47	

U tablici 9. prikazana su tri broja za svaku korelaciju varijabli. Prvi broj prikazuje korelacijski koeficijent. Ako je njegova vrijednost u rasponu od -1 do +1 utvrđena je veza između varijabli. Drugi broj označava broj podataka koji se koristio pri izračunu, a posljednji broj predstavlja p-vrijednost korelacije.

Jedino korelacija frekvencije i udio etanola ima p-vrijednost nižu od 0,05 i smatra se statistički značajnom pri 95 % ili višoj pouzdanosti.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakcija fenolnih spojeva iz majčine dušice uspješno je provedena pomoću visokonaponskog pražnjenja.
2. Tretirani uzorci imaju veći prinos fenola.
3. Tretirani uzorci imaju manju provodnost i veću pH vrijednost i temperaturu od netretiranih uzoraka.
4. Najveći prinos fenolnih spojeva utvrđen je kod ekstrakcije 3 grama uzorka s 50 % etanolom pri frekvenciji 150 Hz i naponu 25 kV. Vrijeme ekstrakcije je 9 minuta.
5. Statističkom obradom varijanci utvrđeno je da ne postoji statistički značajan odnos između frekvencije i mase uzorka te napona i frekvencije.
6. Većina varijabli nema statistički značajnu korelaciju. Jedino se korelacija između frekvencije i napona smatra statistički značajnom pri 95 % pouzdanosti.

6. LITERATURA

Anonymous (2017) Uređaj za visokonaponsko pražnjenje plazma/ high voltage electrical discharge plasma device, < <http://greenvoltex.pbf.hr/> >, Pristupljeno 16 lipnja 2018.

Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.

Boussetta, N., Vorobiev, E. (2014) Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: A review. *C. R. Chim.*, 17: 197 – 203.

Bravo L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56: 317-333.

Chemat F., Vian M.A., Cravotto G. (2012) Green extraction of natural products: concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7): 8615–8627.

Cajner, H. (2011) Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa. Doktorski rad. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, str. 11-19.

Chirinos R., Rogez H., Campos D., Pedreschi R. and Larondelle Y. (2007) Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua. *Separation and Purification Technology*, 55(2): 217-225.

Dragović-Uzelac, V. (2017) Odabrane vrste začinskog i aromatskog bilja.

Herceg Z. (2011) Procesi u prehrambenoj industriji. Plejada, 1 izdanje, Zagreb, str. 98-100.

Kazazić S. P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalna aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 55: 279-290.

Kozakova Z. (2011) Electric Discharges in Water Solutions. Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, str. 4-15.

Lianfu Z., Zelong L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes. *Ultrason Sonochem*, 15(5): 731-737.

Liu D., Vorobiev E., Savoie R., Lanosielle J. L. (2011) Intensification of polyphenols extraction from grape seeds by high voltage electrical discharges and extract concentration by dead-end ultrafiltration. *Separation Purification Technology*, 81: 131-140.

Liyana-Pathirana, C. i Shahidi, F. (2005) Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, 93(1): 47-56.

Luque de Castro M.D., i Garcia-Ayuso L.E. (1998) Soxhlet Extraction of Solid Materials: An Outdated Technique with a Promising Innovative Future. *Analytica Chimica Acta*, 369: 1-10.

Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva, Hinus, Zagreb, str 299.

Mahfoudhi N., Ksouri R., Hamdi S. (2016) Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications in food industry. *Nanotechnology in the Agri- Food Industry*, 3: 365-403.

Milošević S. (2008) Plazma, svjetlost i spektroskopija. Institut za fiziku, Zagreb.

Misra N. N., Tiwari B. K., Raghavarao K. S. M. S. and Cullen P. J. (2011) Nonthermal Plasma Inactivation of Food-Borne Pathogens. *Food Engineering Reviews*, Volume 3: 159-170.

Naczki M. i Shahidi F. (2004) Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal and Chromatography*, 1054: 95-111.

Naczki M. i Shahidi F. (2006) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523–1542.

Nikolić M., Glamočlija J., Ferreira I., Calhella R. C., Fernandes A., Marković T., Marković D., Giweli A., Soković M. (2014) Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and *Reut* and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183– 190.

Pankaj S. K. i Keener K. M. (2017) Cold plasma: background, applications and current trends. *Current Opinion in Food Science*, 16: 49-52.

Peschel W., Sanchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzia I., Jimenez D., Lamuela-Raventos R., Buxaderas S., Codina C. (2006) An industrial approach in search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. *Food Chemistry*, 97: 35-43.

Porrini M., Riso P. (2008) Factors influencing the bioavailability of antioxidants in food: a critical appraisal. *Nutrition, Metabolism, Cardiovascular diseases*, 18(10): 647-650.

Režek Jambrak A. (2011) Experimental Design and Optimization of Ultrasound Treatment of Food Products. *Journal of Food Processing & Technology*, 102.

Schlüter O., Ehlbeck J., Herte C., Habermeyer M., Roth A., Engel K. H., Holzhauser T., Knorr D., Eisenbrand G. (2013) Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Mol. Nutr. Food Res.* 57: 920–927.

Tendero C., Tixier C., Tristant P., Desmaison J., Leprince P. (2006) Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim. acta B*, 61: 2-30.

Toplak Galle K. (2005) Domaće ljekovito bilje. 1. izdanje, Mozaik knjiga, Zagreb.

Wang L. i Weller C. L. (2006) Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 300-312.

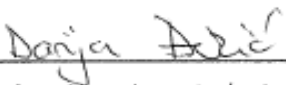
Rajha H., Boussetta N., Louka N., Maroun R. G., Vorobiev E. (2015) Electrical, mechanical and chemical effects of high-voltage electrical discharges on polyphenol extraction from vine shoots. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 31: 60-66.

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


ime i prezime studenta